

что указывали показатели метаболической активности клеток. Различие в показателях функционального состояния ДК было наиболее демонстративным на 9-е сутки инкубирования с индукторами созревания. При этом хантавирус не оказывал активирующего эффекта на ДК без предварительного внесения индуктора, тогда как в отношении клеток, предварительно прошедших дифференцировку под его влиянием, отмечалось его выраженное воздействие на активность кислородзависимой и нитроксидобразующей систем.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа поддержана научным проектом (0545-2014-0011) ФАНО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прокопович С.К., Веницкий В.Б. Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии злокачественных новообразований // *Онкология*. 2001; 3(2–3): 126–131.
2. Алексеев О.И., Храновская Н.Н., Болгова Л.С., Гриневич Ю.А. Цитоморфологические особенности

дендритных клеток // *Цитология и генетика*. 2006; 40(1): 66–69.

3. Raftery M.J., Kraus A.A., Ulrich R., Kruger D.H., Schonrich G. Hantavirus Infection of Dendritic Cells. *J. of Virology*. 2002; 76(21): 10724–10733.

4. Lui G., Manches O., Angel J., Molens J.P., Chaperot L., Plumas J. Plasmacytoid Dendritic Cells Capture and Cross-Present Viral Antigens from Influenza-Virus Exposed Cells. *PLoS ONE*. 2009; 4: e7111.

5. Zaki S.R., Greer P.W., Coffield L.M., Goldsmith C.S., Nolte K.B., Foucar K., Feddersen R.M, Zumwalt R.E., Miller G.L., Khan A.S. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 552–579.

6. Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций. *Тихоокеан. мед. журн.* 2010; 3: 5–9.

7. Lutz M.B. Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rössner S., Koch F., Romani N., Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods*. 1999; 223: 77–92.

8. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. – М.: Мир; 1983; – 264 с.

Сведения об авторах

Ляпун Ирина Николаевна, к.б.н. научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1. e-mail: irina-lyapun@list.ru.

Плехова Наталья Геннадьевна, д.б.н. ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова; заведующая центральной научной исследовательской лаборатории, Тихоокеанский государственный медицинский университет; e-mail: pl_nat@hotmail.com.

Дробот Елена Игоревна, к.б.н. научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; e-mail: eidrobot@mail.ru.

© Бузолева Л.С., 2017 г.
УДК 579.24+579.26

doi: 10.5281/zenodo.817772

Л.С. Бузолева

ОЦЕНКА БИОПЛЕНКОБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В АССОЦИАЦИЯХ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ МИКРОФЛОРОЙ, ВЫДЕЛЕННОЙ С ПОВЕРХНОСТИ РАСТЕНИЙ

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова, г. Владивосток
Дальневосточный Федеральный Университет, г. Владивосток

Исследована способность *Listeria monocytogenes* формировать биоплёнки в консорциуме с сапротрофными бактериями растений с высокой способностью к биопленкообразованию с листериями. Стимулирующие рост штаммы выделены с поверхности помидора, дайкона, яблока и салата. Определены три категории взаимодействия компонентов системы *Listeria monocytogenes* – сапротроф: стимулирование роста, торможение роста, отсутствие влияния.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, биопленки, микрофлора растений.

L.S. Buzoleva

ASSESSMENT BIOFILMFORMATION PROPERTIES OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN ASSOCIATION WITH CONCOMITANT MICROFLORA ALLOCATED FROM THE PLANT SURFACE

Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after GP Somov, Vladivostok, Russia
Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Investigated the ability of *Listeria monocytogenes* to form biofilms in consortium with ipratropium by bacteria isolated from plants. Saprotrophic isolated strains of bacteria with high ability to bioincubation with with *Listeria*. Stimulating the growth of selected strains from the surface of the tomato, daikon, Apple and salad. Defined three categories of interaction between system components *Listeria monocytogenes* – saprotroph: growth stimulation, growth inhibition, no effect.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilms, bacteria, plants.

Listeria monocytogenes является возбудителем тяжёлого инфекционного заболевания людей и животных. Листерия входит в пятёрку наиболее опасных инфекций, вызываемых бактериями [1]. Рядом авторов доказана и широко освещена ведущая роль в распространении листериозной инфекции таких пищевых продуктов как молоко, сыры, сливочное масло, колбасы, мясные полуфабрикаты [2, 3].

Но, в литературе представлены, в основном, эпидемиологические данные, которые не дают представлений о ключевых факторах, оказывающих влияние на изменение биологических свойств патогенных бактерий. При рассмотрении пищевых продуктов в качестве экологической ниши, занимаемой листериями, основное внимание исследователей уделяется изучению динамики численности патогенных бактерий под влиянием абиотических факторов [4, 5], в то время как на свойства возбудителей могут оказывать влияние и биотические факторы среды в связи с тем, что листерии входят в состав биоценозов с сапротрофными микроорганизмами, контаминирующими продукты питания. Кроме того, известно, что одним из механизмов адаптации *L. monocytogenes* является их способность к существованию и размножению в составе биоплёнок [6], что является одной из важнейших проблем современности.

На формирование листериями биоплёнок могут оказывать влияние сапротрофные микроорганизмы, обсеменяющие пищевые продукты, в том числе и растения, что необходимо учитывать при эколого-эпидемиологических исследованиях [7, 8]. Вероятно, биотические взаимодействия наравне с абиотическими факторами играют определенную роль в реализации адаптационных механизмов *L. monocytogenes*, однако, характер этих взаимодействий мало изучен.

Цель работы: изучить способность *L. monocytogenes* формировать биоплёнки в консорциуме с сапротрофными бактериями, выделенными с растений.

Материалы и методы

Для изучения способности листерий к биопленкообразованию использовали штаммы *L. mono-*

cytogenes: 6174, 4835/6, 15861/4, 2780, 5642/6, 8097 и 9156/2 из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова. В качестве тест-культур сапротрофных бактерий были выбраны 8 изолятов, полученных из различных продуктов растительного происхождения: Я-1 и Я-2 – яблоко; О-2 и О-1 – огурец; П-2 – помидор; Д-1 и Д-2 – дайкон; С5-3 – салат.

Опыт проводили в плоскодонных иммунологических планшетах. Культивировали микроорганизмы на бульоне КД с добавлением 1% глюкозы при температуре 22°C в течение 5-и суток. Интенсивность биоплёнкообразования смешанных культур определяли на третьи сутки эксперимента по модифицированному методу, основанному на спектрофотометрической оценке количества связанного с биоплёнкой 1%-го раствора кристаллического фиолетового [9]. Оптическую плотность элюатов измеряли при длине волны 540 нм. В качестве контроля служили значения оптической плотности элюатов, полученные для биоплёнок листерий в монокультуре. Оценивали аддитивность системы согласно стандартному методу [10]. При этом отношение показателя ОП, полученного экспериментально к рассчитанному показателю аддитивности системы учитывали следующим образом: в случае значений < 1 – стимулирование роста, >1 – торможение роста, = 1 – нет взаимодействия компонентов системы [11, 12].

Для статистической обработки полученных данных использовали пакет программ Excel. Выводы сделаны при вероятности безошибочного прогноза $P \geq 0,95$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования была определена способность штаммов *L. monocytogenes* к биопленкообразованию в монокультуре. В результате проведенных исследований, было установлено, что у разных штаммов одного вида *L. monocytogenes* была обнаружена разная способность к биопленкообразованию. Максимально выражена эта способность у штамма 5642/6 (оптическая плотность составила $0,189 \pm 0,02$), а слабыми биопленкообразующи-

ми свойствами обладал штамм. 9156/2 (оптическая плотность данного штамма была равна $0,110 \pm 0,02$).

Эти штаммы были взяты для дальнейшего изучения способности *L. monocytogenes* образовывать биоплёнки совместно с сапротрофными микроорганизмами. В качестве тест-культур были использованы 8 изолятов сапротрофных бактерий, ассоциированных с *L. monocytogenes* на различных растительных продуктах питания.

В результате проведенных исследований было установлено, что оптимальная зрелая биоплёнка *L. monocytogenes* в консорциуме с сапротрофными бактериями образуется уже на 3 сутки. Всего было исследовано 16 вариантов биоплёнкообразования на двух штаммах *L. monocytogenes*: 5642/6, 9156/2. Показано, что биоплёнкообразующими свойствами обладали, как листерии, так и сапротрофы (табл.).

Таблица

Сравнительная характеристика биоплёнкообразующих свойств *L. monocytogenes*, сапротрофных бактерий и консорциумов листерий с сапротрофными бактериями

Номер штамма/ сочетание штаммов	Оптическая плотность смывов (22°C)	Номер штамма/ сочетание штаммов	Оптическая плотность смывов (22°C)
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6	$0,189 \pm 0,02$	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2	$0,110 \pm 0,02$
Я-1	$0,390 \pm 0,01$	Я-1	$0,390 \pm 0,03$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + Я-1	$0,511 \pm 0,01$ (0,8)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + Я-1	$0,622 \pm 0,03$ (1,2)
Я-2	$0,256 \pm 0,03$ (0,4)	Я-2	$0,256 \pm 0,02$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + Я-2	$0,555 \pm 0,03$ (1,2)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + Я-2	$0,575 \pm 0,03$ (1,6)
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + Я-2	$0,555 \pm 0,03$ (1,2)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + Я-2	$0,575 \pm 0,03$ (1,6)
О-2	$0,388 \pm 0,01$	О-2	$0,388 \pm 0,01$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + О-2	$0,642 \pm 0,01$ (1,1)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + О-2	$0,481 \pm 0,01$ (0,98)
О-1	$0,289 \pm 0,02$	О-1	$0,289 \pm 0,02$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + О-1	$0,515 \pm 0,01$ (1,1)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + О-1	$0,534 \pm 0,03$ (1,34)
П-2	$0,246 \pm 0,01$	П-2	$0,246 \pm 0,03$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + П-2	$0,358 \pm 0,01$ (0,8)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + П-2	$0,611 \pm 0,01$ (1,72)
Д-1	$0,291 \pm 0,01$	Д-1	$0,291 \pm 0,02$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + Д-1	$0,464 \pm 0,01$ (0,99)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + Д-1	$0,491 \pm 0,03$ (1,2)
Д-2	$0,244 \pm 0,03$	Д-2	$0,244 \pm 0,01$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + Д-2	$0,703 \pm 0,03$ (1,6)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + Д-2	$0,352 \pm 0,01$ (0,99)
С 5-3	$0,304 \pm 0,03$	С 5-3	$0,304 \pm 0,03$
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + С5-3	$0,770 \pm 0,02$ (1,6)	<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + С 5-3	$0,398 \pm 0,03$ (0,96)

Следует отметить, что максимальная стимулирующая способность биоплёнкообразования обнаружена у штамма *L. monocytogenes* 5642/6 в консорциуме со штаммами Д-2 и С5-3, выделенными с дайкона и салата соответственно, у *L. monocytogenes* 9156/2 в консорциуме со штаммами Я-2 и П-2, выделенными с яблока и помидора соответственно. При этом штамм *L. monocytogenes* слабее образует биоплёнку в монокультуре, а в ассоциации происходит взаимодействие компонентов системы и рост бактерий стимулируется.

Таким образом, способность к биоплёнкообразованию у *Listeria monocytogenes* в монокультуре при 22°C зависит от штамма. В консорциуме листерий с определенными сапротрофами биопленкообразующие свойства усиливаются. Стимулирующие рост штаммы выделены с поверхности помидора, дайкона, яблока и салата. Определены три категории взаимодействия компонентов системы *Listeria monocytogenes* – сапротроф: стимулирование роста, торможение роста, отсутствие влияния.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа поддержана научным проектом (0545-2014-0011) ФАНО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика – М.: Медицина для всех, 2002 – 200 с.
2. Olsen S.J., Patrick M., Hunter S.B. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *J. Clin. Infect. Dis.* 2005; 40: 962–967.
3. Kongo J.M., Malcata F.X., Ho A.J. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in Sao Jorge (Portugal) cheese production. *J. Dairy Sci.* 2006; 89(11): 4456–4461.
4. Сомов Г. П., Бузолева Л. С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. – Владивосток: ОАО «Примполиграфкомбинат», 2004.
5. Wemekamp-Kamphuis H.H., Sleator R.D., Wouters J.A. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte growth of *Listeria monocytogenes*

at low temperatures. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 2912–2918.

6. Бердасова А.С., Бузолева Л.С., Богатыренко Е.А. Образование биоплёнки *Listeria monocytogenes* в консорциуме с сапротрофными бактериями: В кн.: Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Матер. все-рос. симп. с межд. участ. – М.: 2012. 34 с.

7. Leriche, V., Carpentier B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 4: 594–605.

8. Zhao, T., Doyle M.P., Zhao P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 3996–4003.

9. Christensen G. D., Simpson W.A., Younger J.J., Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiology.* 1985; 22(6): 996–1006.

10. Корягин В.В. Аддитивные и неаддитивные оформления совершенства и их эмерджентные определения // *Наука и современность.* 2011; 13(3): 58–66.

11. Пономарева А.Л. Исследование интенсивности образования биопленок *Listeria monocytogenes* при различных температурах // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* 2016; 2 (65): 38–39.

12. Цветкова Н.Б. Изменчивость биологических свойств *Listeria monocytogenes* под влиянием абиотических факторов // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* 2012; 47–48(1–2): 253–257.

Сведения об авторе

Бузолева Любовь Степановна – д.б.н., главный научный сотрудник экологии патогенных бактерий, доктор биологических наук; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, ул. Сельская, дом 1, тел. (423)244-18-88; e-mail: buzoleva@mail.ru

© Белик А.А., Сильченко А.С., 2017 г.
УДК 577.152.321

doi: 10.5281/zenodo.817768

А.А. Белик, А.С. Сильченко

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АЛЬГИНАТ-ЛИАЗЫ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ: СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ БИОПЛЁНОК

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток

Были получены рекомбинантные формы пяти альгинат-лиаз морской бактерии *Formosa algae* KMM 3553 и трех альгинат-лиаз морской бактерии *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549(T). Было показано, что данные ферменты активны в отношении полиманнуриновой, полигулуриновой кислот, а также альгиновой кислоты смешанного типа. Принимая во внимание тот факт, что альгинаты играют существенную роль в образовании биопленок патогенных бактерий, данные ферменты потенциально могут быть использованы в составе средств для обеззараживания поверхностей.

Ключевые слова: альгинат-лиазы, альгиназы, *Formosa algae*, *Pseudoalteromonas issachenkonii*, маннуридат-специфичная альгинат-лиаза, гулуридат-специфичная альгинат-лиаза, биоплёнки

A.A. Belik, A.S. Silchenko

RECOMBINANT ALGINATE LYASES OF MARINE BACTERIA: SUBSTRATE SPECIFICITY AND POTENTIAL OF USAGE IN BIOFILM DEGRADATION

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, Russia

There were expressed recombinant forms of five alginate lyases of marine bacterium *Formosa algae* KMM 3553 and three alginate lyases of marine bacterium *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549(T). By using the method of assaying of reducing sugars it was shown that these enzymes are active against polymannuronic, polyguluronic and mixed type of alginic acids. Taking in account the fact, that alginates play essential role in formation of biofilms of pathogenic bacteria, these enzymes potentially can be used in compositions for disinfection of surfaces.

Keywords: alginate lyases, alginases, *Formosa algae*, *Pseudoalteromonas issachenkonii*, mannuronate-specific alginate lyase, guluronate-specific alginate lyase, biofilms